

Penggunaan Teknik Reaksi Rantai Polimerase (PCR) DNA Proviral dari Virus Enzootic Bovine Leukosis

Retno D. SOEJOEDONO

Laboratorium Imunologi, Jurusan Kitwan Kesmavet Fakultas Kedokteran Hewan
Institut Pertanian Bogor

SUMMARY

A polymerase chain reaction was developed to detect the proviral DNA of bovine leukemia virus in bovine lymphocytes. Milk and blood samples from infected and uninfected cows were tested. None of the bovine leukemia free animals gave a positive response and 58% of the infected cows showed positive signals. When the DNAs 25 μ l of blood, 25.000 lymphocytes or 1.000 lymphocytes were amplified, positive results were recorded more frequently in cows with persistent lymphocytosis than in cows with normal lymphocyte counts.

PENDAHULUAN

Leukosis sapi menular (*enzootic bovine leukemia = EBL*) adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh virus dari *Famili Retroviridae* yang biasa juga disebut sebagai virus leukemia pada sapi (*bovine leukemia virus = BLV*). Penyakit EBL akhir-akhir ini sangat mendapatkan perhatian di negara-negara anggota Masyarakat Ekonomi Eropa (MEE) dan terutama di Perancis karena setelah tahun 1982 dinyatakan sebagai penyakit menular.

Sejak beberapa tahun yang lalu, untuk mendeteksi hewan tertular digunakan teknik serologis berupa uji agar immunodiffusi untuk serum dan uji Elisa untuk serum dan

susu. Leukosis sapi menular merupakan suatu penyakit infeksius dan kontagius. Infeksi yang disebabkan nya merupakan infeksi persisten dan kronik dengan tahapan sebagai berikut : (i) pada tahap awal infeksi hewan tidak memperlihatkan gejala klinis ataupun kelainan hematologis, (ii) pada tahap kedua dijumpai perubahan gambaran darah dimana dijumpai peningkatan jumlah limfosit persisten, dan (iii) bentuk limfosarkoma dimana terjadi perubahan yang tampak secara klinis yaitu munculnya tumor yang diikuti dengan bentuk limfosit persisten (lihat gambar 1). Sifat-sifat dan karakter dari penyakit ini telah dilaporkan oleh Portetelle (1990) dan Toma *et al.* (1990).

Portetelle (1990) melaporkan bahwa identifikasi virus dan antigen dapat dilakukan dengan berbagai cara sebagai berikut : mikroskop elektron, uji serologik, *tirage de cellule*, induksi syntiticum, deteksi adanya asam nukleat virus, dan inokulasi pada hewan percobaan.

Domba merupakan hewan percobaan yang sering digunakan untuk melakukan identifikasi akan penyakit ini. Dalam hal ini hewan percobaan tersebut akan membentuk antibodi dalam jangka waktu 2–3 minggu sampai beberapa minggu setelah inokulasi (Buxton dan Schultz, 1984). Periode mulai adanya antibodi sampai penurunannya dalam tubuh hewan percobaan ditentukan oleh dosis inokulat yang disuntikkan. Periode ini dimulai dari saat penyuntikan inokulum sampai ke terjadinya kematian hewan pada fase tumoral. Makin besar dosis yang disuntikkan, periode tersebut makin pendek (Gatei *et al.*, 1989).

Untuk menimbulkan penyakit pada domba hanya diperlukan inokulasi dengan 200 limfosit dari hewan yang secara klinis sakit dan mengalami limfositosis persisten (Gatei *et al.*, 1989). Sampai saat ini belum dilaporkan adanya suatu teknik yang mudah dan cepat untuk mendeteksi adanya virus pada hewan-hewan yang diduga terinfeksi.

Teknik *Polymerase Chain Reac-*

tion (PCR) mula-mula ditemukan oleh Mullis pada tahun 1984 (Saiki *et al.*, 1985, Mullis dan Falloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988) dan kemudian teknik ini dikembangkan pada laboratorium untuk penelitian biologik (Orkin, 1987; Marx, 1988 dan Schochteman *et al.*, 1988). Dasar dari teknik ini adalah kerja dari enzim DNA polimerase dimana enzim tersebut akan meng-kopi satu rantai DNA, pada satu rantai komplemen melalui proses perpanjangan (*elongation*) yang dimulai dari ujung 3'OH bebas dari rantai oligonukleotida.

Teknik PCR atau teknik reaksi rantai polimerase terdiri dari beberapa siklus amplifikasi suksesif dan akan menghasilkan produk yang berakumulasi secara eksponensial. Tahapan dari teknik amplifikasi ini dapat digambarkan sebagai berikut : (i) denaturasi DNA geromik pada suhu 90–95°C selama 10 menit, (ii) hibridisasi DNA atau fiksasi DNA dengan rantai oligonukleotida, reaksi ini terjadi pada suhu 35–70°C selama 2 menit dan (iii) tahap polimerisasi yang terjadi pada suhu 72°C selama 10 menit. Seluruh tahap tersebut dapat terjadi berulang-ulang sesuai dengan tujuan dikehendaki.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengembangkan teknik PCR dalam mendeteksi adanya DNA provirus dari Leukosis sapi menular dalam berbagai bahan isolat

seperti darah dan susu sapi yang diduga tertular. Dengan teknik ini pula penulis mencoba mengetahui dasar-dasar epidemiologi dari penyakit ini.

Penerapan teknik PCR pada penelitian ini dilakukan pada (i) hewan-hewan yang secara serologis negatif, namun mengandung agen penyakit dalam bentuk viremia, (ii) hewan-hewan yang terinfeksi tetapi keadaan viremianya tidak tetap, dan (iii) sekresi dan ekskresi virulen dari hewan yang terinfeksi berupa susu, darah, air ludah dan sperma.

BAHAN DAN METODE

BAHAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah dan susu sapi yang diperoleh dari sapi perah dari peternakan sapi perah di daerah *Vosges dan Mayenne (Perancis)* yang telah diikuti jalannya penyakit selama kurang lebih 3 tahun (Tabel 1 dan 2). Untuk kontrol negatif digunakan bahan-bahan yang diperoleh dari peternakan di daerah *Yonne (Perancis)*. Dari seluruh daerah tersebut diperoleh bahan untuk diperiksa sebanyak 36 contoh darah dan 36 contoh susu dari sapi-sapi terinfeksi dan 19 contoh darah dan 19 contoh susu dari sapi-sapi yang bebas penyakit secara klinis dan serologis. Penelitian tersebut dilakukan di *Laboratorium Penya-*

kit Menular (Service des Maladies Contagieuses) Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort, Maison Alfort, France, mulai dari tahun 1987 sampai akhir 1989.

Ekstraksi DNA virus :

Masing-masing bahan yang diperiksa mengalami ekstraksi DNA virus dengan metode seperti tersebut di bawah ini : *a.1. Metoda pemanasan* (Holmes dan Quigley, 1981). Setelah masa inkubasi biakan sel selama 48 jam, media biakan dibuang dan biakan sel dipanen. Biakan sel tersebut disentrifusasi pada 1200 putaran per menit selama 10 menit. Kemudian endapan dilarutkan dalam 200 μ l akuades steril. Suspensi tersebut diinkubasi pada suhu 100°C selama 10 menit (Thermoblock, Bioblok Scientific) kemudian dilewatkan pada suhu 0°C selama 15 menit.

a.2. Ekstraksi DNA sel dengan Proteinase K. Kepada 5 ml biakan sel yang telah mengalami masa inkubasi 48 jam ditambahkan 10 ml larutan Phosphate Buffered Saline (PBS), kemudian larutan tersebut disentrifusasi pada 200 x G selama 10 menit. Endapan yang terjadi dilarutkan dalam 10 ml larutan PBS, kemudian disentrifusasi kembali. Selanjutnya endapan ditambah dengan larutan bufer (50 mM KCL, 10 mM Tris HCL dengan pH 7.0, 2.5 mM MgCl², 0.7 mg/ml gelatin, 0.45% Nonidet P40, 0.45% Tween 20 dan 10 mg/ml Proteinase K) sehingga didapatkan 6×10^6 sel per ml. Larutan di

atas kemudian diinkubasi pada 50–60°C selama 1 jam dan 95°C selama 10 menit.

b. Ekstraksi DNA yang berasal dari darah.

b1. Ekstraksi DNA leukosit (Higuchi, 1989). Larutkan 0.5 ml darah dalam 0.5 ml larutan bufer lisis. Sentrifusasi suspensi di atas pada 12.000 putaran/menit selama 20 detik, hal tersebut diulangi 3x. Endapan yang dihasilkan dilarutkan dalam 0.5 ml larutan yang mengandung 50 mM KCL, 10 mM Tris HCL pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml gelatin dan 0.45% Nonidet P40, 0.45% Tween 20 dan Proteinase K 10 mg/ml. Tahapan terakhir, larutan di atas diinkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam, kemudian pada suhu 95°C selama 10 menit.

c. Ekstraksi DNA sel leukosit dari air susu.

Lima ml air susu disentrifusasi pada 5.000 putaran/menit. Endapan dilarutkan dalam 0.5 ml NaCl fisiologis, dan tambahkan 0.5 ml larutan bufer lisis dan diikuti dengan proses sentrifusasi pada 12.000 putaran/menit selama 20 detik, ulangi 3x. Endapan tersebut dilarutkan dalam 0.5 ml dari 50 mM KCL, 10 mM Tris HCL pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml gelatin, 0.45% Nonidet P40, 0.45% Tween 20 dan Proteinase K 10 mg/ml. Larutan itu diinkubasi pada suhu 50–60°C selama 1 jam dan kemudian suhu 95°C selama 10

menit. Teknik reaksi rantai polimerase (PCR) merupakan suatu teknik kuantitatif, fragmen DNA yang diinginkan akan diamplifikasi sebanyak 10⁶ x. Proses tersebut dapat direalisasikan dalam berbagai tahap dengan *Thermal Cycler DNA* (Cetus, Perkin Elmer). Program tersebut adalah sebagai berikut : tahap denaturasi awal 95°C selama 5 menit dan diikuti dengan tahap denaturasi 94°C selama 2 menit; tahap hibridisasi pada 63°C selama 1 menit dan diakhiri dengan tahap pemanjangan (ekstensi) pada 72°C selama 2 menit. Tahapan denaturasi sampai akhir amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus.

Untuk teknik ini digunakan ekstrak DNA dari masing-masing bahan yang berasal dari darah maupun air susu, dan menggunakan fragmen nukleotida (primer) D₁D₂ yang terletak pada daerah intergenik GaG-Pol dari gen virus EBL. Fragmen ini mempunyai ukuran sebesar 100 pasangan basa (base pair). Pada proses amplifikasi ini digunakan model sebagai berikut :

- 25.0 ul DNA dari bahan
- 2.5 ul larutan bufer PCR 10x (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl gelatin)
- 2.0 ul fragmen primer D₁D₂ (1 uM konsentrasi akhir)
- 8.0 ul dNTP (200 uM setiap tipe)
- 0.5 ul enzim Taq polimerase (2.5 U)
- 12.0 ul akuades steril

Untuk menghindari proses peng-uapan dari larutan di atas selama proses amplifikasi, maka perlu ditambahkan larutan *inertal oil* (Perkin Elmer) yang menutup permukaan larutan.

Identifikasi DNA setelah amplifikasi

Identifikasi dilakukan dengan cara *elektroforesis* pada agarose *Nusieve 3.8%* yang mengandung 1% bromur etidium dan proses hibridisasi pada membran nitroselulose atau nilon. Identifikasi dengan *elektroforesis* : 10–25 ul larutan hasil amplifikasi dideteksi dengan menggunakan agarose *Nusieve 3.5%* yang mengandung 1% bromur etidium, garis yang terbentuk mempunyai ukuran 100 pasangan basa dibandingkan dengan kontrol DNA 123 pasangan basa. Identifikasi pada membran nitroselulose : mula-mula 10 ul larutan hasil amplifikasi didenaturasi secara kimiawi, dengan menggunakan larutan basa (1N NaOH dan 3M NaCl), kemudian dilarutkan kembali kedalam larutan 20x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Na sitrat pH : 7.0) sehingga mendapatkan konsentrasi akhir 10 x SSC. Sepuluh ul larutan di atas difiksasi pada membran nitroselulose dengan menggunakan *filtration minifold* dan kemudian membran tersebut mengalami hibridisasi dengan perunutan nonradioaktif yang mengandung sekuens D₁D₂ yakni oligonukleotida S₂ untuk selanjutnya dideteksi dengan teknik Elisa.

HASIL PENELITIAN

Pada penelitian ini hasil dari amplifikasi dideteksi dengan menggunakan berbagai teknik yaitu *elektroforesis* dan hibridisasi non-radioaktif dengan perunutan dioxigenin alkalin fosfatase.

Pada bahan-bahan yang didapat dari hewan yang bebas penyakit didapatkan bahwa 10 contoh bereaksi negatif dengan menggunakan metode *elektroforesis* maupun dengan hibridisasi nonradioaktif (nonisotop). Dari uji-uji ini dapat dihitung bahwa spesifisitas uji PCR adalah 100%. Tiga puluh tiga bahan hewan sakit yang diidentifikasi menunjukkan hasil positif dengan IDG, yang berasal dari 6 peternakan Vosges dan Mayenne. Pada diferensiasi darah telah dilakukan untuk setiap hewan, DNA leukosit yang berasal dari 25 ul darah, 25.000 limfosit dan 1.000 limfosit telah diamplifikasikan dan hasilnya dianalisis pada gel agarose. Dan diikuti proses hibridisasi dengan S₂. DNA seluler yang berasal dari endapan sel setelah proses sentrifusasi 5 ml susu juga telah mengalami identifikasi seperti pada DNA leukosit. Apabila hasil identifikasi negatif maka dilakukan uji ulang sebanyak 2 kali, sedangkan bila hasilnya dubius maka dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Sedangkan dari 33 bahan dari hewan-hewan sakit (secara klinis maupun serologis) didapatkan hasil 19 positif dengan *elektroforesis*,

sehingga sensitifitasnya adalah 58% dan dengan hibridisasi didapatkan hasil 13 bahan positif atau dengan kata lain sensitifitasnya adalah 39% (Tabel 3).

Hasil yang diperoleh dari hewan sakit di atas dengan menggunakan teknik amplifikasi enzimatis dan diferensial darah menunjukkan bahwa hasil positif lebih banyak dijumpai pada hewan sakit yang mengandung limfosit persisten daripada sapi sakit dengan jumlah limfosit normal (Tabel 4).

Teknik identifikasi hasil amplifikasi digunakan secara paralel yang bertujuan untuk perbandingan terlihat pada gambar 2. DNA berasal dari hewan sakit pada berbagai konsentrasi dilarutkan dalam DNA hewan sehat :

- 20 ul dari larutan yang mengandung hasil amplifikasi (berasal 50 ul dari larutan reaksi) diidentifikasi melalui *elektroforesis* pada gel agarose yang diwarnai dengan bromur etidium. Garis yang terbentuk diukur berdasarkan berat molekulnya (100 pasangan basa).
- 10 ul dari larutan yang mengandung hasil amplifikasi diidentifikasi pada membran nitroselulose dan dihibridisasi dengan oligonukleotida S₂.

Selain itu dapat dibuktikan bahwa dengan teknik amplifikasi ini hasil positif selalu terdapat pada hewan dengan tahap limfositosis positif yang juga berarti bahwa

jumlah limfosit dari hewan terinfeksi dengan gejala limfositosis selalu lebih tinggi daripada pada hewan terinfeksi tanpa gejala limfositosis (Gambar 2 dan 3).

PEMBAHASAN

Data yang didapat dari penelitian ini dianalisis berdasarkan beberapa kriteria sebagai berikut: *Kemungkinan uji untuk diulang (repeatability)*. Kemungkinan untuk melakukan kembali suatu uji baik oleh peneliti ataupun oleh orang lain merupakan suatu kriteria dasar yang harus dituntut terhadap suatu hasil pengujian dalam penelitian.

Pada awal penelitian, dirasakan bahwa hasil ulangan sangat kurang memuaskan karena adanya keragaman antara ulangan satu dengan lainnya. Hal ini diduga karena terjadinya kontaminasi contoh bahan oleh tempat penanganan, alat maupun larutan yang digunakan sebelum dan sesudah amplifikasi. Untuk mengatasi hal tersebut maka dilakukan pemisahan tempat penanganan sebelum dan sesudah teknik PCR sehingga didapatkan hasil pengulangan yang memuaskan.

Berbagai uji telah dilakukan dalam penggunaan sekuens oligonukleotida yang lebih panjang (25 mer) dan suhu hibridisasi yang lebih tinggi sehingga menghasilkan gambaran yang lebih jelas pada *elektroforesis* maupun hibridisasi pada membran nitrocellulose.

Uji spesifisitas teknik ini tidak menimbulkan problem. Dalam hal ini perlu untuk diperhatikan bahwa peralatan (tabung reaksi, pipet dan sebagainya) maupun larutan pereaksi yang digunakan dapat merupakan sumber kontaminasi bagi hasil amplifikasi. Hal ini akan mengganggu gambaran yang terlihat pada proses *elektroforesis* maupun dalam hibridisasi pada membran nitrocellulose.

Uji sensitifitas sangat terbatas. Dibandingkan dengan uji immunodiffusi gel (IDG), uji sensitifitas teknik ini amat terbatas karena adanya perbedaan parameter yang digunakan diantara keduanya. Uji IDG merupakan uji identifikasi adanya antibodi dalam darah, sedangkan teknik PCR merupakan cara deteksi DNA provirus dalam limfosit. Perbedaan antara IDG dan PCR juga berhubungan erat dengan perbedaan jumlah limfosit yang beredar dalam darah sebagai pembawa DNA proviral dalam limfosit darah hewan yang sakit. Hal tersebut dapat diperlihatkan dengan jelas pada penggunaan teknik PCR pada 25 ul darah dari hewan sakit dalam tahap limfositosis : darah tersebut akan memberikan hasil positif. Hasil positif juga didapat dari penelitian yang menggunakan 25.000 dan 1.000 limfosit. Sehingga dapat dikatakan bahwa pada keadaan limfositosis, jumlah limfosit yang terinfeksi oleh virus EBL meningkat dan demikian pula sebaliknya (Esteban *et al.*, 1985).

Secara eksperimen dapat ditunjukkan bahwa domba yang disuntik dengan limfosit hewan sakit dalam keadaan limfositosis, lebih mudah terserang penyakit daripada domba norma (Buxton dan Schultz, 1984). Dari penelitian yang dilaporkan ini dapat disimpulkan bahwa teknik PCR dapat digunakan untuk identifikasi apakah hewan-hewan yang memberikan hasil IDG positif merupakan bahaya bagi hewan-hewan sekelilingnya. Hal ini terjadi karena hanya hewan-hewan dengan uji PCR positiflah yang berbahaya bagi hewan lainnya, karena hanya merekalah yang menyebarkan bahan virulen ke lingkungan.

Bila teknik PCR memberikan hasil positif dan diulang beberapa bulan, maka hasil uji ini dapat merupakan dasar untuk menyeleksi apakah hewan-hewan yang diuji tersebut benar-benar sakit, setelah diperkuat oleh hasil percobaan pada domba.

Penggunaan teknik ini antara lain adalah untuk mengetahui apakah suatu kelompok hewan yang sakit berbahaya atautkah tidak terhadap lingkungannya. Bila ternyata hewan sakit tersebut memberikan reaksi PCR negatif, maka ia kurang berbahaya bagi lingkungannya.

Akhirnya, boleh dikatakan bahwa teknik PCR sangat penting dalam segi epidemiologi leukosis sapi menular, karena dengan teknik ini dapat diketahui adanya sekresi

virulen dari hewan penderita, atau identifikasi hewan sakit namun tidak mendapatkan kekebalan kolosal yang pada saat diadakan uji serologik hewan tersebut tidak menunjukkan hasil yang jelas.

KESIMPULAN

Mengingat bahwa kerugian ekonomis yang mungkin dapat ditimbulkan, dan mengingat pula bahwa puluhan ribu ekor sapi perah telah didatangkan ke Indonesia dari daerah tertular leukosis sapi menular (EBL, dari Amerika Serikat), maka peranan EBL di Indonesia menjadi sangat penting karena penyakit sapi ini sangat menular. Kepentingan ini menjadi lebih besar lagi dengan digalakkannya peternakan sapi perah rakyat di berbagai daerah di Indonesia. Sebagian besar peternak di negeri kita ini merupakan peternak-peternak kecil dan dengan modal yang amat terbatas. Sehingga kerugian yang amat kecilpun kami rasa dapat menggoncang pendapatannya.

Mengingat kepentingan ekonomi dari penyakit ini dan kehandalan uji yang penulis teliti, penulis berusaha menarik kesimpulan dari apa yang dikerjakannya dalam hal teknik PCR. Dari pengalaman percobaan pengerjaan teknik-teknik, baik kegagalan maupun keberhasilannya, dan dari pengamatan hasil penelitian ini penulis dapat menarik beberapa hal yang

menjadi sifat-sifat khusus teknik *Polymerase Chain Reaction (PCR)*, yaitu bahwa :

1. Teknik reaksi rantai polimerase dapat dikembangkan sebagai sarana deteksi yang sensitif dan spesifik untuk hewan-hewan yang terinfeksi oleh virus EBL.
2. Kekhasan teknik ini adalah kemampuan untuk mengetahui adanya hewan terinfeksi yang dalam aliran darahnya beredar limfosit pembawa DNA proviral. Dengan demikian uji ini dapat pula mendeteksi adanya hewan-hewan yang kurang potensial peranannya dalam penyebaran bahan virulen ke lingkungannya.
3. Teknik ini mempunyai peranan yang tidak dapat diabaikan dalam epidemiologi, pencegahan, pengendalian dan pemberantasan leukosis sapi menular di Indonesia.

UCAPAN TERIMA KASIH

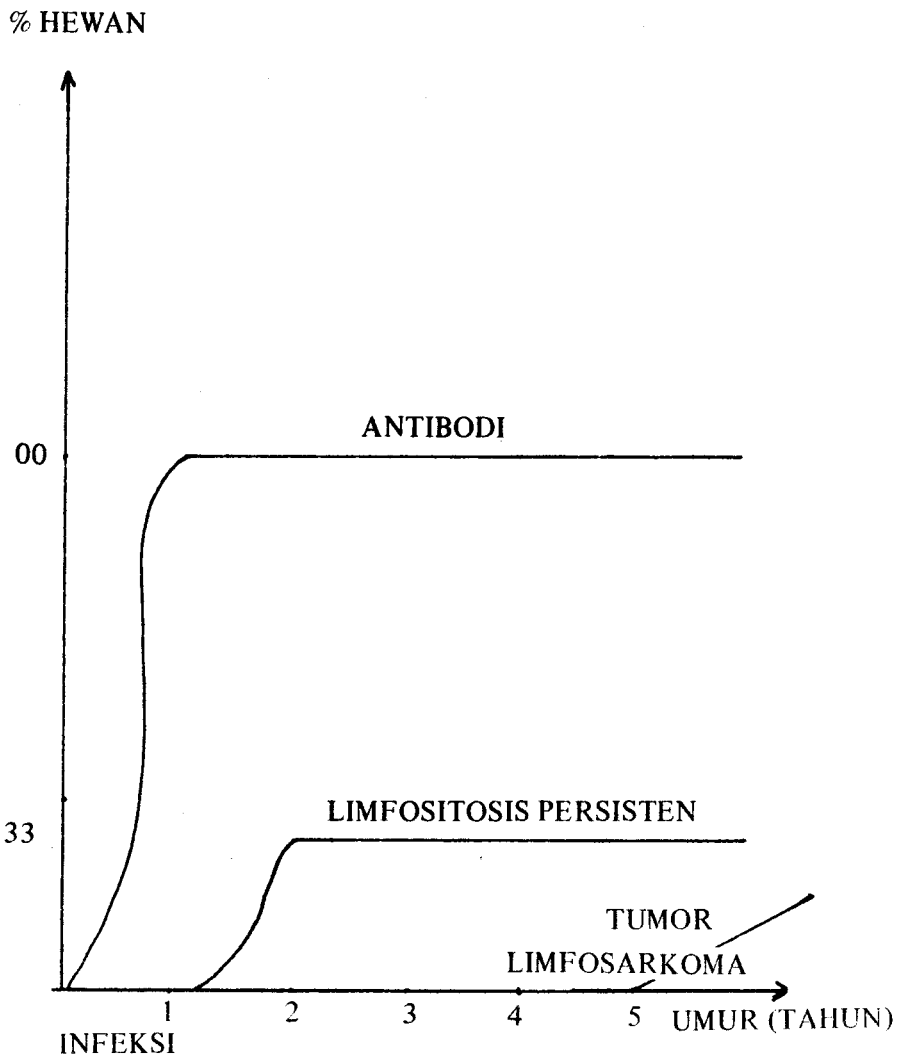
Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. B. Toma, Dr. M. Eloit, atas bimbingan dan saran sehingga penelitian dan penulisan ini terwujud. Rasa terima kasih juga penulis sampaikan kepada Dr. Fachriyan H. Pasaribu, Drh. Titiek Sunartatie, Drh. Joko Pamungkas, Drh. Denny Widaya Lukman dan Drh. M. Fachrudin atas bantuan teknis yang diberikan dalam penulisan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agut H et Hureau J.M. 1990. La place de l'amplification genique (PCR) en microbiologie. *Bull. de la Societe Francaise de Microbiologie* 5 : 1-2.
- Brisson A.N., Lecossier B., Nassif X., Giquel B., Frebault V.L. and Hance A.L. 1989. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *The Lancet* 25 : 189-198.
- Buxton B.A. and Shultz R.D. 1984. Factors affecting in the infectivity of lymphocytes from cattle with bovine leukosis virus. *Can. J. Med.* 84 : 365-369.
- Clewy J.P. 1989. The Polymerase Chain Reaction : a review of the practical limitations for human immunodeficiency virus diagnosis. *J. of Virol. Meth.* 25 : 179-188.
- Erllich H.A., Gelfand D.H. and Saiki R.K. 1989. Specific DNA amplification. *Nature* 331 : 461-466.
- Esteban E.C., Thorn R.M. and Ferrer J.F. 1985. Characterization of the blood lymphocyte population in the cattle infected with the Bovine leukemia virus. *Cancer Research* 45 : 3225-3226.
- Gatei M.H., Mc Lennan M.W., Lavin M.F. and Daniel R.C.W. 1989. Experimental infection of sheep with Bovine leukemia virus infectivity of blood, nasal and saliva secretion. *J. Vet. Med. B.36* : 652-660.
- Higuchi R. 1989. Rapid efficient DNA extraction for PCR from cell or blood. *Amplifications*, 2, 1-3.
- Holmes D.S. and Quigley. 1981. A rapid oiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry* pp 193-197.
- Kawasaki E.S. Clark S.S., Coyne M.Y., Smith D.S., Champlin R., Witte No.O., and Mc Cornick F.P. 1988. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia specific mRNA sequence amplified in vitro. *Proc. Natl. Acad. Science. U.S.A.* 85, 5698-5702.
- Kemp D.J., Smith D.B., Foote S.J., Samaras N and Peterson G. 1989. Colometric detection of specific DNA segment amplified by polymerase chain reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 2423-2427.
- Ketmann R., Couez D and Burny A. 1981. Restriction endonuclease mapping of linear unintegrated proviral DNA of leukemia virus. *J. of Virol.* 38 : 27-33.
- Laure F., Rouziouk C., Weber F., Jaconet C., Cournaud V., Blanche S., Bugard M., Greiselli C and Brechot C. 1988. Detection of HIV DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. *The Lancet* 3, 538-540.
- Larzul D., Guigue F., Snicky J.J., Mack D.H., Brechot C. and Ghesdon J.L. 1988. Detection of the Hepatitis B virus sequences in serum by using in vitro enzymatic amplification. *J. of Virol. Meth.* 20, 227-237.
- Marx J.L. 1988. Multiplying genes by leaps and bound. 1988. *Science.* 240, 1408-1410.
- Orkin S.H. 1987. Genetic diagnosis by DNA analysis. 1987. *N. Engl. J. Med.* 817 : 1023-1024.
- Portetelle D. 1990. Leucose bovine enzootique et virus de la leucemia bovine. Memoire presente en vue d'agregation de l'enseignement superieur.

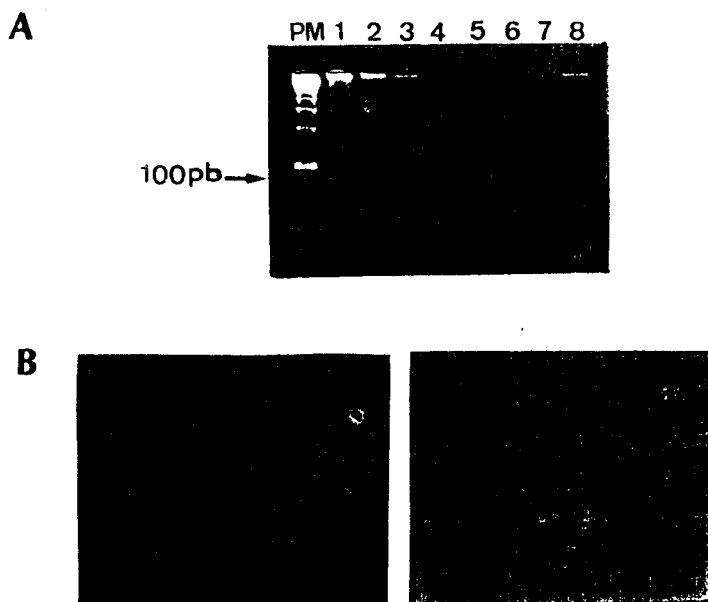
eur. Faculte de Sciences Agronomique. Gembloux.

- Sagata N., Yasunaga T., Tsuzuku Kawamura J., Onuma J. and Ikawa Y. 1985. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus : Its evolutionary relationship to other retrovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 677-681.
- Schotchetman N., Ou C.J. and Jonse W.K. 1988. Polymerization chain reaction. *J. Infect. Dis.* 158, 1154-1157.
- Shibata D.K., Arnheim N., and Martin W.J. 1988. Detection of human papilloma virus in parafin embedded tissue using the polymerization chain reaction. *J. Exp. Med.* 167 : 225-230.
- Syvanen A.C., Bengstrom M., Yukka T and Soderlund H. 1988. Quantification of polymerase chain reaction products by affinity based hybrid collection. *Nucleic acid Research.* 23 : 11327-11338
- Toma B., Eloit., M et Savey M. 1990. Les maladies animales a retrovirus: leucose bovine enzootique, anemia infectieux des equides, arthrite-encephalite caprine, O.I.E.



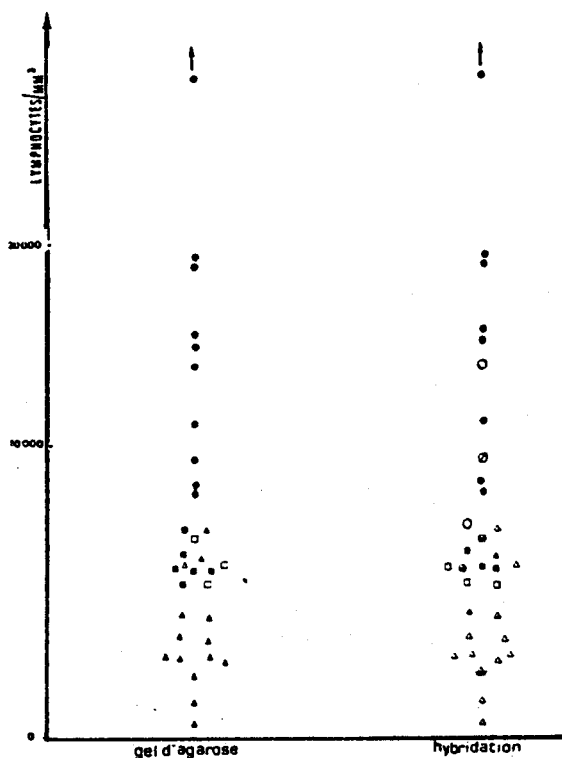
Gambar 1 : Gambaran penyakit pada sapi akibat infeksi virus EBL.

Gambar 2 : Identifikasi dari fragmen 100 bp. dari daerah intergenik GaG-Pol yang telah diamplifikasi dengan teknik PCR dari hewan sakit karena infeksi virus EBL (Vosges 3, No. : 17).



- A. elektroforesis : 1 : 25 ul darah (400.000 limfosit); 2: 1.5 ul darah (250.000 lifosit); 3 : 0.06 ul darah (1.000 limfosit); 4 : 0.03 ul darah (500 limfosit); 5 : 0.006 ul darah (100 limfosit); 6 : 0.0006 ul (10 limfosit); 7 : 0.00006 ul (1 limfosit ; 8 : 25 ul darah hewan sehat.
- B. penandaan hasil amplifikasi dengan oligonukleotida S2 (dengan model yang sama dengan A).

Gambar 3 : Hasil yang diperoleh dari sapi sakit melalui teknik PCR berdasarkan penghitungan jumlah limfosit dan keadaan darah dari kunci *Benedixen*



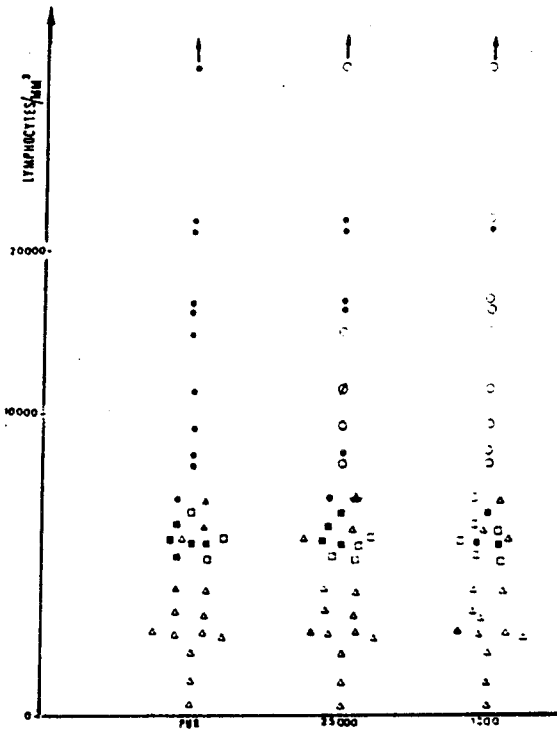
Hasil akhir dinyatakan positif bila menunjukkan reaksi positif, demikian pula untuk hasil yang meragukan (dubius) dan hasil negatif.

Limfositosis PCR positif
 PCR dubius
 PCR negatif

Limfositosis dubius PCR positif
 PCR dubius
 PCR negatif

Tidak ada limfositosis PCR positif
 PCR dubius
 PCR negatif

Gambar 4 : Hasil yang diperoleh dari hewan sakit melalui teknik PCR berdasarkan penghitungan limfosit dan keadaan darah.



Jumlah limfosit berdasarkan pada 25 ul darah atau jumlah 25000 atau 1000 limfosit yang diteliti (absis).

Hasil akhir dinyatakan positif bila menunjukkan reaksi positif, demikian pula untuk hasil yang meragukan (dubius) dan hasil negatif.

Limfositosis PCR positif
 PCR dubius
 PCR negatif

Limfositosis dubius PCR positif
 PCR dubius
 PCR negatif

Tidak ada limfositosis PCR positif
 PCR dubius
 PCR negatif

Tabel 1. Contoh darah dan air susu dari peternakan VOSGES.

Peternakan	Sapi	Umur/tahun	I.D.G.
I	1	6	+
	2	6	+
	3	5	+
	4	4	+
	5	7	+
	6	5	+
II	7	7	+
	8	8	+
	9	8	+
	10	7	+
	11	5	+
III	12	8	+
	13	5	+
	14	6	+
	15	4	+
	16	8	+
	17	12	+

Tabel 2. Contoh darah dan air susu dari daerah MAYENNE.

Peternakan	Sapi	Umur/tahun	I.D.G.
I	1	8	+
	2	4	+
	3	2.5	+
	4	3.5	+
	5	4	+
	6	5	+
II	7	4	+
	8	6	+
	9	2.5	+
	10	6	+
	11	4	+
	12	2.5	+
	13	4	+
III	14	7	+
	15	3	+
	16	6	+
	17	5	+
	18	3	+
	19	6	+

Tabel 3. Analisa hasil yang diperoleh setelah amplifikasi DNA leukosit pada gel agarose dan membran nitroselulosa.

Untuk analisis hasil, suatu isolat dinyatakan positif apabila menunjukkan hasil positif.

A. Gel agarose

	IDG Positif	
PCR Positif	19	Sensitifitas = $19/33 = 0,58$
Dubius	0	
Negatif	14	
	<hr/>	
	33	

B. Membran selulosa

	IDG Positif	
PCR Positif	13	Sensitifitas = $13/33 = 0,39$
Dubius	4	
Negatif	16	
	<hr/>	
	33	

Tabel 4. Hasil akhir yang diperoleh setelah amplifikasi DNA leukosit dan analisa pada gel agarosa dengan deferensial darah dari hewan.

A. Gel agarosa

		Limfositis		
PCR		Positif	Dubius	Negatif
	Positif	11	5	3
	Dubius	0	0	3
	Negatif	0	3	11

B. Membran nitroselulosa

		Limfositis		
PCR		Positif	Dubius	Negatif
	Positif	8	3	2
	Dubius	1	2	1
	Negatif	2	3	11